

## ARTÍCULO CIENTÍFICO

Helena Reichel,<sup>1</sup>  
Leonardo Mariño,<sup>1</sup>  
Jean Kummert<sup>2</sup>,  
Silvio Belalcázar<sup>3</sup>  
y Javier Narváez.<sup>1+</sup>

## ABSTRACT

**Title: Characterization of the Coat Protein Gene of two Cucumber Mosaic Virus (CMV) Isolates from Plantain and Banana (*Musa spp*)**

The final objective of this study is to genetically engineer cucumber mosaic virus (CMV) resistance in edible *Musa spp.* in Colombia, by means of expressing the CMV coat protein gene in transgenic plants. This strategy has been successfully employed in other crops. CMV was serologically detected in leaves of commercially grown bananas (cv. Gros Michel) and plantains (cv. Dominico-Harton) showing mosaic symptoms. CMV was partially purified from infected tissue of *Nicotiana tabacum*. Transmission electron microscopy examination showed the presence of viral isometric particles of approximately 30 nm in diameter. The molecular weight of the coat protein subunit was approximately 28 kDa as determined by SDS-PAGE. Analysis of double-stranded RNA (dsRNA) indicated that the isolations present in both varieties had similar dsRNA profiles, characteristic of CMV. cDNA was reverse transcribed using viral dsRNA as the template, and the coat protein genes (CPG) of the two CMV isolates were amplified by the polymerase chain reaction (PCR). The amplified products of approximately 890 bp, containing the CPG, were cloned into the plasmid vector Bluescript KS (+/-). Based on the pattern obtained from the digestion of the amplified CP genes with *Msp*I and DNA sequencing data, the two CMV isolates were classified into the serotype subgroup I (typified by isolate DTL). Computer analysis of DNA sequences of the CP genes derived from both CMV isolates showed a 99% homology between them at the nucleotide and amino acid level as well as a high level of conservation with other members of the CMV subgroup I. The CPG of CMV are now being cloned into plant transformation vectors for their genetic engineering into banana and plantain commercial cultivars.

**Key Words:** CMV, viral genes, molecular virology, transgenic plants

1. Programa Nacional de Biotecnología Agrícola, CORPOICA, Apartado 240142-Las Palmas, Santafé de Bogotá, Colombia; 2. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Laboratoire de Pathologie Végétale, 2, Passage des Déportes, B-5030 Gembloux, Belgique; 3. Programa Regional Agrícola 9, CORPOICA, A.A. 1287, Manizales, Caldas, Colombia. +. Autor para correspondencia.

## Caracterización del Gen de la Proteína de la Cápside de Dos Aislamientos del Virus del Mosaico del Pepino (CMV), Obtenidos de Plátano y Banano (*Musa spp*)

## RESUMEN

El presente estudio se adelantó dentro de un proyecto de investigación para obtención de plantas resistentes al virus del mosaico del pepino (CMV), mediante la transformación y expresión del gen de la proteína de la cápside de CMV en plantas transgénicas de variedades comerciales de plátano y banano (*Musa spp*). Se trata de una estrategia reciente que ha sido utilizada con éxito en varios cultivos comerciales. El CMV fue detectado serológicamente (DAS-ELISA) en hojas de plátano cv. Dominico Hartón y de banano cv. Gros Michel que presentaban síntomas de mosaico. El virus se purificó parcialmente a partir de hojas infectadas de *Nicotiana tabacum* y con la ayuda del microscopio electrónico de transmisión, se identificaron partículas isométricas de aproximadamente 30 nm de diámetro. El peso molecular de la proteína de la cápside en geles desnaturalizados de poliacrilamida (SDS-PAGE) fue de 28 kDa. El patrón electroforético del RNA viral de doble cadena (dcRNA) fue similar para los dos aislamientos de CMV obtenidos de plátano y banano. Utilizando la dcRNA como patrón, se sintetizó cADN por transcripción reversa y, a partir de éste, se amplificaron por PCR los genes de la proteína de la cápside (GPC) de ambos aislamientos. Los productos de la amplificación de aproximadamente 890 pares de bases (pb), que contenían el GPC, se clonaron en el plásmido vector Bluescript KS (+/-). El análisis de restricción con endonucleasas y la secuenciación del GPC de ambos aislamientos, indicó que éstos pertenecen al subgrupo I (tipificado por el aislamiento DTL). El análisis de la secuencia nucleotídica y de aminoácidos de ambos genes, indicó una homología del 99% y un alto grado de conservación con otros miembros del subgrupo I de CMV. El GPC se está clonando en plásmidos vectores para su transformación en variedades comerciales de plátano y banano en Colombia.

**Palabras Claves:** Mosaico del banano, CMV, proteína de la cápside, genes virales, virología molecular, plantas transgénicas.

## INTRODUCCIÓN

EL BANANO Y el plátano (*Musa spp.*), son alimentos básicos de la canasta familiar de los colombianos y su exportación genera importantes divisas para la economía nacional. Colombia es el tercer productor mundial de banano con un área cultivada de 30.000 ha. El plátano es cultivado en una extensión aproximada de 350.000 ha, con una producción que supera los 2.5 millones de toneladas anuales, destinadas en un 86% al consumo interno y el resto a la exportación. El sistema de producción predominante es de tipo minifundista, en el que aproximadamente 154.000 productores poseen cultivos con menos de 5 ha y 13.000 medianos productores poseen entre 5 y 20 ha, éstas últimas dedicadas principalmente a la exportación (Belalcázar, 1991).

Las enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus constituyen uno de los mayores limitantes de la producción de

plátano y banano (Belalcázar, 1991). En los últimos años, el virus del mosaico del pepino (CMV) (Francki *et al.*, 1985), agente causal de la enfermedad mosaico del banano (Yot-Dauthy y Bové, 1966; Jones, 1994), se viene presentando con mayor incidencia en plantaciones de éstos cultivos en la zona cafetera, donde se produce cerca del 70% del plátano del país (Belalcázar, 1991; Castaño *et al.*, 1994). Las plantas infectadas por CMV son más pequeñas, presentan síntomas de mosaico en las hojas y producen pocos frutos, de menor tamaño y con desarrollo incompleto. En casos severos, las plantas infectadas mueren (Jones, 1994).

El CMV pertenece al grupo de los cucumovirus y es uno de los más diseminados en el mundo, con más de 800 especies hospederas que incluyen plátano, banano, maíz, frijol, hortalizas, tabaco, etc. El virus puede ser transmitido a través de la semilla por medios mecánicos y por más

de 60 especies de áfidos vectores (Francki *et al.*, 1985; Jones, 1994). Se han identificado alrededor de 39 aislamientos de CMV, clasificados en dos grandes serogrupos, el subgrupo I, tipificado por el aislamiento DTL, que predomina en el trópico y en el subtropical; mientras que el subgrupo II, tipificado por el aislamiento ToRS, prevalece en regiones de la zona templada (Devergne y Cardin, 1973; Kearney *et al.*, 1990).

No se conocen fuentes naturales de resistencia genética a CMV en germoplasma de *Musa spp.* La obtención de plantas transgénicas con resistencia a virus mediante la expresión del gen de la proteína de la cápside (GPC), es una estrategia empleada con éxito en cultivos como tabaco, tomate, papa, alfalfa, cohombro y papaya (Powell-Abel *et al.*, 1988; Gonsalves y Slinghton, 1993). El GPC del aislamiento C de CMV ha sido expresado en plantas transgénicas de tabaco, tomate y cohombro, demostrando un grado de protección significativo a dicho aislamiento (Quemada *et al.*, 1991; Xue *et al.*, 1994). Técnicas de ingeniería genética (Sagi *et al.*, 1995; May *et al.*, 1995) han sido aplicadas exitosamente para la producción de plantas transgénicas de banano, lo cual abre la posibilidad de aplicar la tecnología del GPC para obtener plantas de *Musa spp.* resistentes a CMV.

Este trabajo describe el aislamiento y caracterización molecular del GPC de dos cepas de CMV obtenidas de las variedades de plátano Dominico- Hartón y de banano Gros Michel.

## Materiales y Métodos

*Aislamiento y purificación parcial del CMV.* Se tomaron muestras de tejido foliar con síntomas de mosaico de las variedades de banano Gros Michel (genoma AAA) y de plátano Dominico-Hartón (genoma AAB), procedentes del municipio de Caicedonia, Valle del Cauca. La presencia de CMV se confirmó mediante serología (DAS-ELISA) (Clark y Adams, 1977) y rango de hospederos.

Siguiendo el método de Lot *et al.*, (1972), a partir de tejido foliar de *Nicotiana tabacum cv. Samsun* infectado con el CMV, se obtuvo una purificación parcial del virus. Se utilizaron 73 gramos de tejido joven foliar, al cual se le adicionaron 146 ml (2 volúmenes) de tampón citrato de sodio 0,5 M, a pH de 7,5, con ácido tioglicólico al 0,1%. Este material se homogenizó en una licuadora a 4°C, se le adicionó igual volumen de cloroformo y se homogenizó nuevamente. Después de centrifugar a 8.000 g por 12 min a 4°C, el sobrenadante se filtró a través de fibra de vidrio. Al filtrado se le

agregaron 36,5 ml (un cuarto del volumen de extracción inicial) de una solución 1M de NaCl y polietilenglicol (PM 6.000<sup>3</sup>) al 40% y se colocó en agitación a 4°C por 90 min. Se dejó en reposo 30 min y se centrifugó a 8.500 g por 20 min. Al precipitado se le adicionaron 15 ml de tampón de citrato de sodio 0,05M a pH de 7,5 y se centrifugó a 5.000 g por 10 min. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 50.000 g por 90 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le adicionaron 4 ml de tampón citrato de sodio 0,05 M a pH de 7,5; y se mantuvo a 4°C durante 24 h; finalmente se centrifugó a 5.000 g por 5 min a 4°C y se colectó el sobrenadante.

La morfología de las partículas virales se determinó con la ayuda de un microscopio electrónico de transmisión (MET), mediante tinción negativa con acetato de uranilo al 2% usando una dilución en agua destilada 1:20 del purificado parcial del virus. La concentración del virus se estableció midiendo la absorbancia del purificado parcial de CMV con un espectrofotómetro (Ultraspec II LKB Biochrom), en el rango de 240-280 nm. Se utilizó un coeficiente de extinción de 5.0 (Francki *et al.*, 1985).

*Electroforesis de la proteína de la cápside en gel de poli(acrilamida).* Se mezclaron volúmenes iguales del purificado parcial del CMV con una solución desnaturalizada, compuesta de 1 ml de Tris-HCl 0.5 M a pH de 6.8, 1.6 ml de SDS al 10% 0.4 ml de 2-mercaptoetanol y 0.8 ml de glicerol. La mezcla se colocó en agua hirviendo durante 5 min y luego se aplicaron 4.5 mg de proteína de la cápside en un gel de poli(acrilamida) al 10%, en forma desnaturalizada (SDS-PAGE), según el método de Laemmli (1970). La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis vertical (BioRad Lab., Inc. CA), en geles de 1x73x100 mm y se analizó a corriente constante de 15 mA durante 2 h.

*Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de cDNA.* Para el análisis del ácido ribonucleico viral de doble cadena (dcRNA), se utilizó el método de Dodds y Morris (1984), con ligeras modificaciones. Aproximadamente 3,5 gramos de tejido foliar de *N. benthamiana* infectado separadamente con los dos aislamientos de CMV, fueron pulverizados rápidamente en un mortero con nitrógeno líquido. El material pulverizado se mezcló con 2 volúmenes de tampón de extracción STE (SDS al 10%, bentonita al 1% y 2-mercaptoetanol al 0,5%). Luego se adicionaron 2 volúmenes de STE saturado con fenol (2 ml/g tejido foliar) en 0,5 volú-

menes de cloroformo/1-pentanol (24:1 v/v). La emulsión de fenol se dejó a temperatura ambiente por 30 min con agitación ocasional. Después de centrifugar a 8.000 g por 15 min a 4°C, la fase acuosa se separó y se llevó a una concentración final de etanol al 16,5% y se le adicionó fibra de celulosa Whatman CF 11 (0,1g fibra /g de tejido foliar). Esta mezcla se agitó durante 45 min a temperatura ambiente. La suspensión se colocó en una columna de celulosa cromatográfica y se dejó filtrar completamente. Para eliminar el DNA y las cadenas sencillas de RNA, la columna se lavó con 100 ml de STE, con etanol al 16,5% y se enjuagó con 0,3 ml de tampón STE. Las dcRNA se recuperaron de la columna con 1,2 ml de STE y se precipitaron posteriormente con 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se centrifugó a 8.000 g por 30 min y el precipitado se secó y se resuspendió en 30 ml de tampón TAE (0,04M Tris-acetato, pH 7,8, 1mM EDTA). Se analizaron 10 ml de dcRNA mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%, con tampón TAE. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 mg/ml).

Siguiendo el método de Rizo *et al.* (1992), con ligeras modificaciones, se sintetizó DNA copiado a partir del dcRNA purificado, empleando la enzima transcriptasa reversible y hexanucleótidos aleatorios (Superscript kit de BRL).

*Diseño de primers y amplificación del GPC.* El GPC fue amplificado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se diseñaron dos oligonucleótidos ("primers") con base en las regiones conservadas del RNA<sup>3</sup> de once cepas de CMV pertenecientes a ambos subgrupos serológicos. Para la región anterior 5' del GPC se utilizó el oligonucleótido ("upstream primer") 5'-GGCGAATTCGCTTCTCCA/GCGAG-3' y para la región posterior ("downstream primer") 5'-ATCGGATCCGTAAGCTGGATGGAC-3' (Pharmacia, Biotech). La mezcla de amplificación incluyó 5 ml de cDNA, 200 µM dNTP, 2.4 ng/µl de cada primer, 1.5 µM de Mg<sup>++</sup> y 0.04 U/µl de DNA polimerasa (Dynazyme Life Sciences International BV), en un volumen final de 50 µl. Se utilizó el termociclador para PCR (Biometra cycler, Gottingen) y la muestra se incubó a 94°C por 5 min, seguida por 5 ciclos de 30 s a 94°C; 1 min a 42°C y 90 s a 72°C. Luego se realizaron 30 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 60°C y 90 s a 72°C. Al final se mantuvo a 72°C durante 5 min. y la reacción continuó a temperatura de 4°C. El producto amplificado se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, en tampón TAE.

*Clonación, análisis de restricción y secuenciación del GPC.* El producto amplificado por PCR se clonó dentro del sitio *EcoR* I y *Bam*H I del plásmido vector pBluescript KS (+/-). Células competentes de *Escherichia coli* JM105 (Pharmacia, Biotech) fueron transformadas con el GPC. Los recombinantes se analizaron con las enzimas de restricción *Pvu*l I y *Hind* III. El GPC fue digerido además con *Msp* I, para la clasificación serológica de ambos aislamientos. Los productos de estas digestiones fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

La secuencia nucleotídica del GPC de ambos aislamientos del CMV se determinó usando el paquete de secuenciación T7 Sequenase Versión 2.0 (Amersham), con ligeras modificaciones (Barker, 1993). Los extremos 5' y 3' del GPC se secuenciaron usando los *primers* T3 y T7. Para secuenciar la región interior se diseñaron *primers* teniendo en cuenta regiones conservadas del GPC de otros aislamientos de CMV del subgrupo I (Owen y Palukaitis, 1988; Owen *et al.*, 1990). Las secuencias nucleotídicas y aminoácidas correspondientes a los GPC de ambos aislamientos se compararon entre sí y con respecto a las de otros miembros del subgrupo I de CMV, empleando los programas "BLASTN" y "BLASTP" (Altschul, 1990), en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) del National Institutes of Health (NIH), USA.

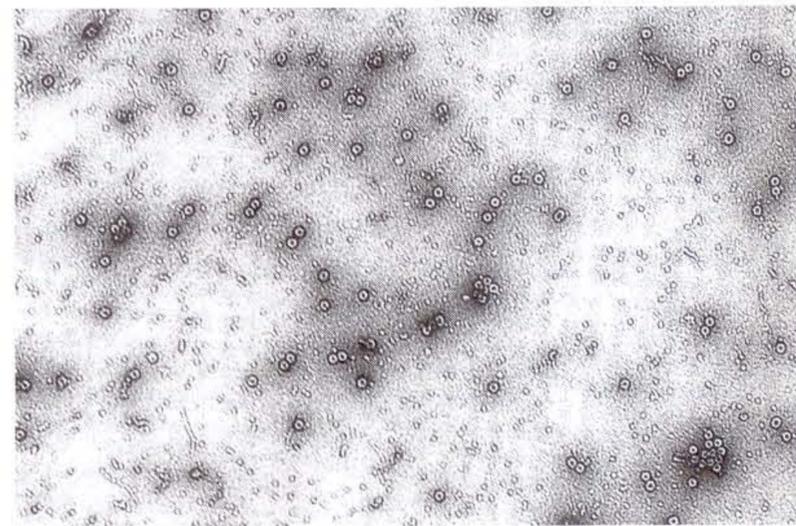
**Resultados y Discusión**

*Diagnóstico y purificación parcial del CMV de plátano y banano*

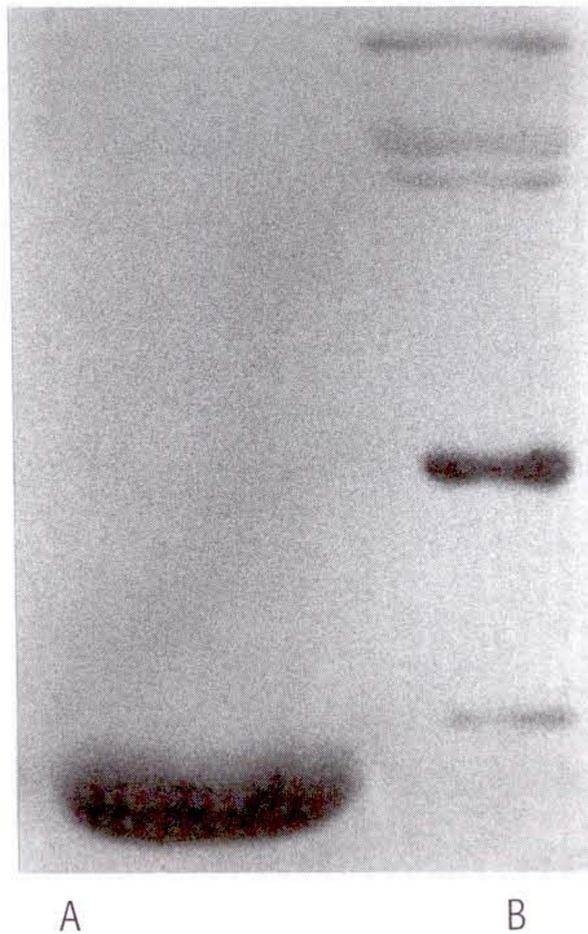
El CMV fue detectado en hojas de plátano Dominico Hartón y de banano Gros Michel que presentaban síntomas de mosaico mediante serología y rango de hospederos. La purificación parcial del CMV se consiguió a partir de plantas de *N. tabacum* infectadas con el virus. El purificado presentó un espectro de absorción ultravioleta de una nucleoproteína, con un  $A_{260/280}$  de 1.27 y una concentración aproximada de 8.8 mg/ml.

El análisis al microscopio electrónico del purificado parcial de CMV indicó la presencia de partículas virales isométricas con un diámetro aproximado de 30 nm (Figura 1), características del CMV (Franchi *et al.*, 1985). De igual manera, el estudio electroforético del virus semipurificado en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), reveló la presencia de una banda predominante de aproximadamente 28 kDa (Figura 2), correspondiente a la subunidad de la proteína de la cápside de CMV (Castaño *et al.*, 1991). Los anteriores análisis permitieron

**Figura 1.** Microfotografía electrónica de partículas isométricas de aproximadamente 30 nm de diámetro, observadas en una purificación parcial de CMV.



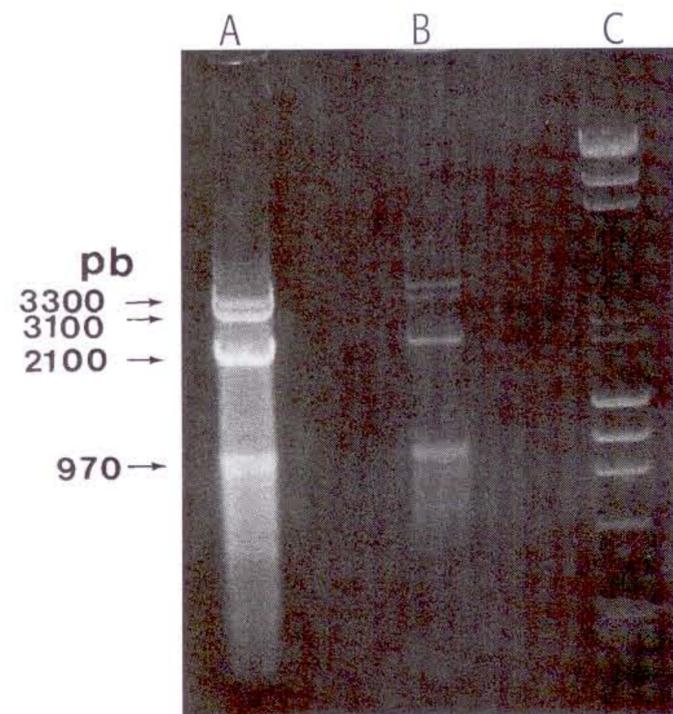
**Figura 2.** (A) Electroforesis (SDS-PAGE) de la purificación parcial de CMV mostrando la subunidad proteica obtenida de Dominico-Hartón. (B) marcadores de peso molecular alto (alto peso Biorad)



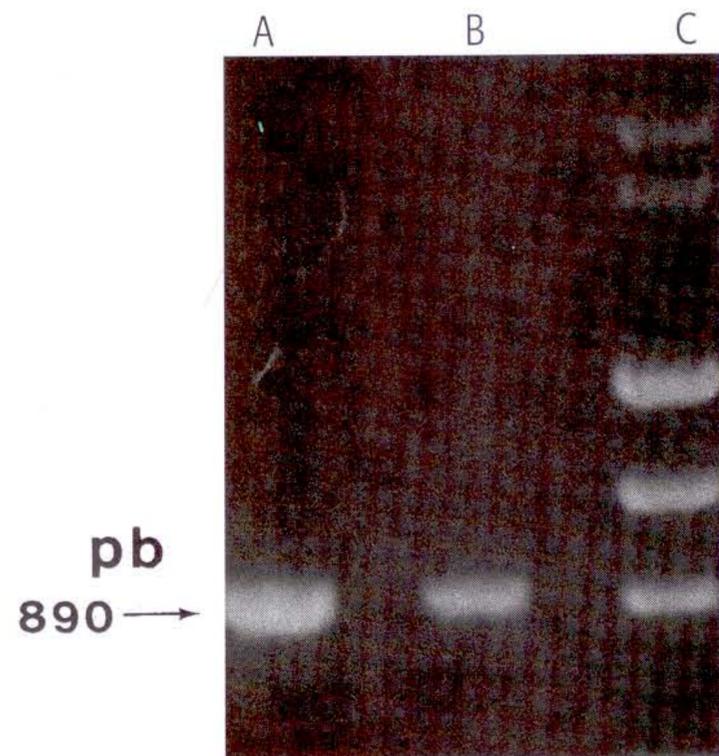
confirmar claramente la presencia de CMV en el material bajo estudio.

*Amplificación y clonación del GPC.* Se consiguió aislar el dcRNA de los aislamientos de CMV de plátano (CMV-DH) y banano (CMV-GM). El patrón electroforético observado en geles de agarosa fue similar para ambos aislamientos y consistió en cuatro bandas de aproximadamente 3300, 3100, 2100, y 970 pares de bases (pb) (Figura 3); las cuales corresponden respectivamente al RNA 1, RNA 2, RNA 3 y RNA 4, característicos del CMV (Valverde *et al.*, 1991). No se detectó la presencia de ningún satélite (Figura 3; Kearney *et al.*, 1990).

El GPC de ambos aislamientos de CMV se amplificó por PCR a partir del cADN sintetizado del dcRNA viral, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 890 pb (Figura 4). El producto de la amplificación se clonó en el plásmido pBluescript KS (+/-) y los recombinantes positivos se confirmaron mediante análisis con varias enzimas de res-



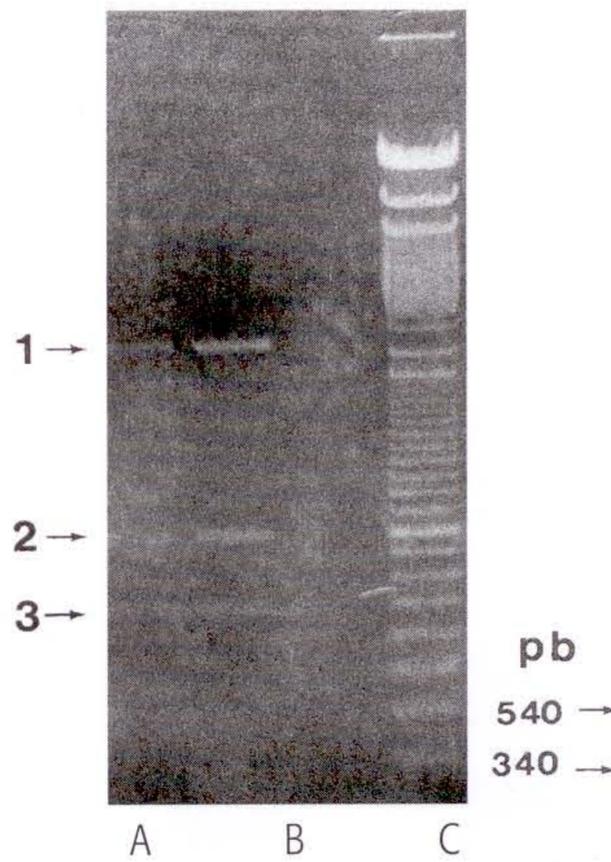
**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de dcRNA extraídos de tejido foliar de *Nicotiana benthamiana* infectada con CMV. (A) *N. benthamiana* inoculada con el aislamiento de CMV-DH; (B) *N. benthamiana* inoculada con el aislamiento de CMV-GM; (C) Marcador de peso molecular Lambda ADN *Hind* III & *Hae* III. El gel fue analizado a 80 V por 1.5 h.



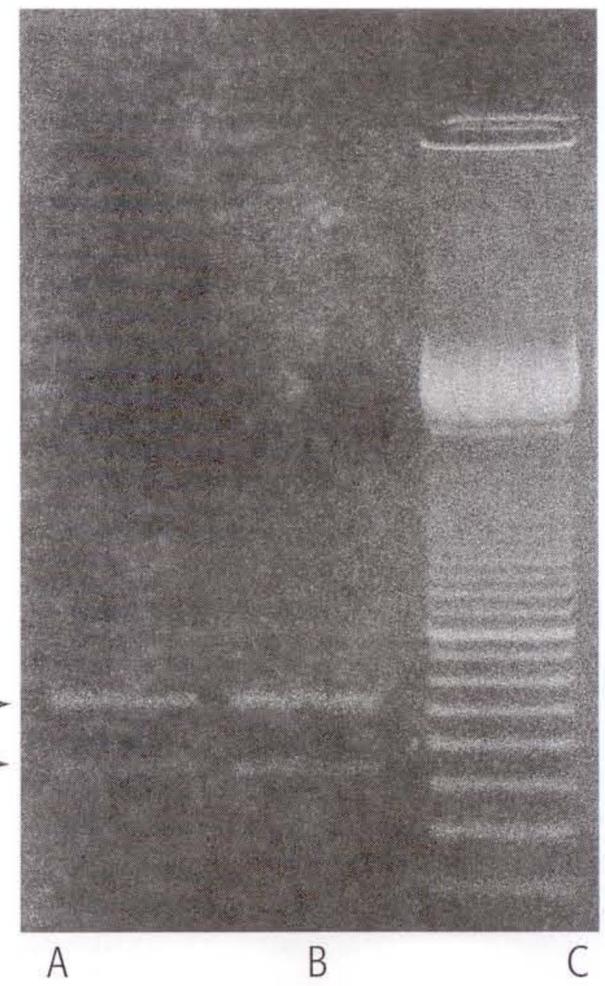
**Figura 4.** Producto de la amplificación por PCR del GPC de los aislamientos de CMV obtenidos de las variedades (A) Dominico-Hartón y (B) Gros Michel. (C) Marcador de peso molecular  $\lambda$  (ADN) *Hind* III & *Hae* III.

tricción. La digestión con la enzima *Pvu* II indicó la presencia de un sitio de restricción para *Pvu* II en el GPC de ambos aislamientos de CMV (Figura 5), mientras que la restricción con la enzima *Hind* III demostró la presencia de un sitio de restricción para esta enzima en el GPC del aislamiento de CMV-GM, el cual estuvo ausente en el aislamiento de CMV-DH. Por otro lado, la digestión del GPC con la enzima *Msp* I produjo dos fragmentos de aproximadamente 540 y 340 pb (Figura 6), indicando que ambos aislamientos de CMV pertenecen al subgrupo serológico DTL, de acuerdo con lo encontrado por Rizos *et al.* (1992).

*Secuenciación y análisis comparativo de los GPC.* El resultado de la secuenciación completa de los GPC, de los dos aislamientos de CMV, indicó que ambos genes están conformados por 657 nucleótidos que codifican para una proteína de 218 aminoácidos (Figura 7). Las secuencias del GPC de los aislamientos CMV-DH y CMV-GM fueron depositadas en el Banco de Genes ("GenBank") del NIH, USA, con los números de accesoión U 32858 y U 32859, respectivamente. El análisis comparativo de la secuencia nucleotídica del GPC de ambos aislamientos de CMV, indicó un 99% de homología, existiendo diferencias solamente entre cinco de sus nucleótidos. La alineación de las secuencias aminoacídicas putativas (deducidas) de los dos genes, igualmente demostró una alta homología (99%), distinguiéndose en sólo cuatro aminoácidos



**Figura 5.** Digestión con *Pvu* II del plásmido Bluescript KS (+/-) con el inserto del GPC (A) CMV-DH y (B) CMV-GM. (1) Plásmido linearizado de 2,500 bp; (2 y 3) fragmentos del gen de la CP de 800 bp y 500 bp, respectivamente; (C) Marcador de peso molecular 1 + 100 bp DNA Ladder (BRL).



**Figura 6.** Productos de la digestión con *Msp* I del GPC amplificado por PCR. (A) CMV-DH; (B) CMV-GM; (C) Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (BRL).

**Figura 7.** Alineación de las secuencias putativas de aminoácidos de las proteínas de la cápside de los aislamientos CMV-DH y CMV-GM y de otros dos miembros del subgrupo I de CMV (accesiones # M98501 y M57602 del GenBank). Las diferencias entre aminoácidos están señaladas con un asterisco.

CMV-DH	MDKSESTSAGRNRRRRPRRGRSRSASSSSDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVG
CMV-GM	MDKSESTSAGRNRRRRPRRGRSRSASSS- DANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVG
M98501	MDKSESTSAGRNRRRRPRRGRSRSASSADANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVG
M57602	MDKSESTSAGRNRRRRLRRGRSRSASSSSDANFRVLSQQLSRLNKTLAAGRPTINHPTFVG
	1 10 20 30 40 50 60
CMV-DH	SERCKPGYTFTSITLKPPKIDRGSYYGKRLLL PDSVTEYDKKLVSRIQIRVNPLPKFDST
CMV-GM	SERCKPGYTFTSITLKPPKIDRGSYYGKRLLL PDSVTEYDKKLVSRIQIRVNPLPKFDST
M98501	SERCKPGYTFTSITLKPPKIDRGSYYGKRLLL PDSVTEYDKKLVSRIQIRVNPLPKFDST
M57602	SERCKPGYTFTSITLKPPKIDRGSYYGKRLLL PDSVTEYDKKLVSRIQIRVNPLPKFDST
	61 70 80 90 100 110 120
CMV-DH	VWVTVRKVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRADLGDM
CMV-GM	VWVTVRKVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDPSAMRADI GDM
M98501	VWVTVRKVPASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRADI GDM
M57602	VWVTVRKVSASSDLSVAAISAMFADGASPVLVYQYAASGVQANNKLLYDLSAMRADI GDM
	121 130 140 150 160 170 180
CMV-DH	RKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD I EHQRIPTSRVLPV
CMV-GM	RKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD I EHQRIPTSRVLPV
M98501	RKYAVLVYSKDDALETDELVLHVD I EHQRIPTSRVLPV
M57602	RKYAVLVYSKDDALETDELVLHVDVEHQRIPTSRVLPV
	181 190 200 210

(Figura 7). De igual manera, se encontró un alto grado de conservación con el GPC de otros miembros del subgrupo I de CMV (Figura 7), tal como ha sido reportado previamente (Owen y Palukaitis, 1988; Owen *et al.*, 1990). Adicionalmente, se detectó la presencia del aminoácido prolina en la posición 129 de la secuencia de aminoácidos deducidas del GPC de los dos aislamientos de CMV, el cual ha sido asociado con la capacidad de ciertos aislamientos de inducir síntomas de mosaico en hojas de plantas infectadas (Shintaku, 1991; Shintaku *et al.*, 1992). El GPC está siendo ahora clonado en un "cassette" de expresión para su futura transformación en plantas de plátano y banano.

#### AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue parcialmente financiado por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (COLCIENCIAS), la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) y por una beca del Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID), Canadá, otorgada a H. Reichel. Los autores agradecen al Dr. P. Lepoivre por permitir que parte de éste trabajo se desarrollara en el Laboratoire de Pathologie Végétale, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux, Bélgica.

#### BIBLIOGRAFÍA

Altschul, S.F., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biology* 215: 403-410.

Barker, D. F. 1993. A more robust, rapid alkaline denaturation sequencing method. *Biotechniques* 14: 168-170.

Belalcázar, S. 1991. El Cultivo de Plátano en el Trópico. Manual de Asistencia Técnica No. 50. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Comité Departamental de Cafeteros del Quindío, Centro Internacional para el Desarrollo (CIID-IDRC), Red Internacional para el Mejoramiento del Plátano y el Banano (INIBAP).

Castaño, M., Galvez, G.E., Arroyave, J.A., Velasco, A.C., and Morales, F.J. 1994. Aislamiento de una cepa colombiana del virus del mosaico del banano. *Rev. ASCOLFI* 18: 130-134.

Clark, M.F., and Adams, A.M. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.

Devergne, J.C., and Cardin, L. 1973. Contribution a l'étude du virus de la mosaïque du concombre (CMV) IV.- Essai de classification de plusieurs isolats sur la base de leur structure antigenique. *Ann. Phytopathol.* 5:409-430.

Dodds, J.A., Morris, T.J., and Jordan, R.L. 1984. Plant viral double-stranded RNA. *Ann. Rev. Phytopathol.* 22: 151-168.

Francki, R. Y., Milne, R. C., and Hatta, T. 1985. Cucumovirus. En: Atlas of Plant Viruses. Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 53-65

Gonsalves, D., and Slingtom, J.L. 1993. Coat protein-mediated protection: analysis of transgenic plants for resistance in a variety of crops. *Seminars in Virology* 4:397-405.

Jones, D.R. 1994. Risks involved in the transfer of banana and plantain germplasm. In: The Improvement and Testing of *Musa*: a Global Partnership. Proceedings of the First Global Conference on the International *Musa* Testing Program held at FHIA, Honduras. INIBAP. pp. 89-90

Kearney, C.M., Zitter, T.A., and Gonsalves, D. 1990. A field survey for serogroups and the satellite RNA of cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 8: 1238-1243.

Laemmli, U.K. 1970. Most commonly used discontinuous buffer systems for SDS electroforesis. *Nature* 227, 680.

Lot, M.J., Quinot, J.B., and Esvan, C. 1972. Contribution a l'étude du virus de la mosaïque du concombre (CMV). I. Methode de purification rapide du virus. *Ann. Phytopathol.* 4: 25-38.

May, G.D., Rownak, A., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J., and Arntzen, C.J. 1995. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformations. *Bio/Technology* 13: 486-492.

Owen, J., and Palukaitis, P. 1988. Characterization of cucumber mosaic virus I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* 166: 495-502.

Owen, J., Aeschleman, P., Tahar, B.S., and Palukaitis, P. 1990. Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 3. *J. Gen. Virology* 71: 2243-2249.

Powell-Abel, P., Nelson, R.S., De, B., Hoffman, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T., and Beachy, R.N. 1988. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.

Quemada, H.D., Gonsalves, D., and Slightom, J.L. 1991. Expression of coat protein gene from cucumber mosaic virus strain C in *Tabacco*: protection against

infections by CMV strains transmitted mechanically or by aphids. *Phytopathology* 81: 794-802.

Rizos, H., Gunn, L.V., Pares, R.D., and Gillings, M.R. 1992. Differentiation of cucumber mosaic virus isolates using the polymerase chain reactions. *J. Gen. Virol.* 73: 2099-2103.

Sagi, L., Panis, B., Remy, S., Schoofs, H., De Smet, K., Swennen, R., and Cammue, B.P.A. 1995. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. *Bio/Technology* 13:481-484.

Shintaku, M. 1991. Coat protein gene sequences of two cucumber mosaic virus strains reveal a single amino acid change correlating with chlorosis induction. *J. Gen. Virology* 72: 2587-2589.

Shintaku, M.H., Zhang, L., and Palukaitis, P. 1992. A single amino acid substitution in the coat protein of cucumber mosaic virus induces chlorosis in tobacco. *Plant Cell* 4: 751-757.

Valverde, R.A., Nameth, S. T., and Jordan, R.L. 1991. Analysis of double stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74 : 255-258.

Xue, B., Gonsalves, C., and Providenti, R. 1994. Development of transgenic tomato expressing a high level of resistance to cucumber mosaic virus strains of subgroups I and II. *Plant Disease* 78: 1038-1041.

Yot-Dauthy, D., and Bové, J.M. 1966. Mosaïque du bananier: identification et purification de diverses souches du virus. *Fruits* 21: 449-464.